Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. W. Zimmermann

Antivirale Antikörper im Liquor cerebrospinalis

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes

1973

vorgelegt von

Bansing Go
geb. am 6. 2. 1933 in Sepandjang/Indonesien

Dekan: Prof. Dr. H. Kulenkampff
Referent: Prof. Dr. med. R. Wigand

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr.med., Dr.phil. W. Zimmermann

Antivirale Antikörper im Liquor cerebrospinalis

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1972

vorgelegt von
Bansing Go
geb. am 6.2.1933 in Sepandjang/Indonesien

Dekan: Prof.Dr. H. Kulenkampff
Referent: Prof. Dr.med. R. Wigand

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Prüfung wurde am 9. Januar 1973 abgelegt.

INHALTSÜBERSICHT

I. Einleitung 1

II. Material und Methodik 2

III. Ergebnisse des Hämagglutinationshemmungstestes .. 9

IV. Ergebnisse der Komplementbindungsreaktion 12

V. Besprechung der Ergebnisse 15

VI. Befunde aus dem Schrifttum 17

VII. Zusammenfassung 22

VIII. Schrifttumverzeichnis 23

I. EINLEITUNG

Bei der Syphilis wird schon lange ein Antikörpernachweis im Liquor cerebrospinalis geführt. Dagegen wurde das Vorkommen von Antikörpern im Liquor bei verschiedenen bakteriellen und viralen Erkrankungen nur sehr wenig untersucht. Sicherlich kann man nicht bei allen Viruserkrankungen mit positivem Antikörpernachweis im Serum auch im Liquor Antikörper auffinden.

In unserer Arbeit versuchen wir, mittels einfachen serologischen Untersuchungsmethoden diese Tatsache näher zu ergründen und häufig auftretende Antikörper nachzuweisen. Untersucht wurden gleichzeitig entnommene Proben von Liquor und Serum von beliebigen erwachsenen Personen. Mit Hilfe des Hämagglutinationshemmungstestes suchten wir nach Hämagglutinations-Antikörper in Serum und Liquor gegen Influenza-A_2 (Hongkong). Mittels der Komplementbindungsreaktion untersuchten wir auf das Vorkommen komplementbindender Antikörper gegen Influenza-A_2-, Mumps- und Adeno-Virusgruppen-Antigen.

Weiterhin sollen aus der vorhandenen Literatur die im Liquor gefundenen antiviralen Antikörper zusammengestellt werden.

II. MATERIAL UND METHODIK

1. Patienten:

In dieser Studie wurden 5o Serum-Liquor-Paare von beliebigen erwachsenen Patienten der Universitäts-Nervenklinik Homburg sowie 2o einzelne Liquores aus der genannten Klinik untersucht.

2. Gewinnung von Serum und Liquor:

Den Patienten wurden Blutproben ohne Zusatz gerinnungshemmender Mittel entnommen. Die Proben wurden 5 Minuten lang zentrifugiert (2.5oo U/min). Das überstehende Serum wurde steril in Flaschen abgefüllt. Seren und Liquores wurden 3o Minuten in einem Wasserbad bei 56° inaktiviert und bis zur weiteren Verwendung bei einer Temperatur von -2o° eingefroren. Die Liquores wurden durch Lumbalpunktion entnommen, wurden ebenfalls in sterile Flaschen abgefüllt und auch bis zur weiteren Verwendung bei einer Temperatur von -2o° eingefroren.

3. Hämagglutinationshemmung (HA-Hemmung):

Influenza-Viren besitzen die Fähigkeit, Menschenblutkörperchen zu agglutinieren. Die HA-Hemmung durch Antikörper von Menschen nach einer Infektion ist allgemein bekannt, ebenso die Tatsache, daß auch unspezifische Inhibitoren die virusbedingte Hämagglutination hemmen können. Wir führten die Reaktion auf Plexiglasplatten mit runden Vertiefungen zur Aufnahme der Reagenzien aus.

a) Reagenzien:

Zur Ausführung der HA-Hemmung sind folgende Reagenzien notwendig:

1. Menschenblutkörperchen (MBK), Blutgruppe 0,
2. die zu untersuchenden Seren,
3. die zu untersuchenden Liquores,
4. das hämagglutinierende Virus.

ad 1.

Menschenblutkörperchen, Blutgruppe O:
Aus den Armvenen eines Patienten mit der Blutgruppe O unter Zusatz von Na-Citratlösung entnommenes Blut wurde dreimal mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen. Eine 2%ige MBK-Suspension in o,9%iger Kochsalzlösung unter Zusatz von 1/5o Pufferlösung nach Mc Ilvaine (pH 7,2) benutzten wir zur HA-Reaktion.

ad 2. und 3.

Die bereits bei der Gewinnung von Serum und Liquor beschriebenen Serum-Liquor-Paare sind nach Auftauen verwendungsfähig.

ad 4.

Als Hämagglutinin benutzten wir Allantois-Flüssigkeit vom Hühnerei nach Infektion mit Virus Influenza-A_2 (Hongkong). Das Antigen wurde vor Gebrauch 3o Minuten auf 56^{o} erhitzt und danach im Kühlschrank aufbewahrt.

b) Austestung des Hämagglutinins:

Zur Austestung stellten wir in den Vertiefungen von Plexiglasplatten eine Verdünnungsreihe des Virus mit dem Faktor 2 her, mit 1:4 beginnend. Die Verdünnung erfolgte mit isotonischer Kochsalzlösung unter Zusatz von 1/5o Mc Ilvaine-Puffer. Die Menge des verdünnten Hämagglutinins betrug jeweils o,4 ml. Hinzu kamen o,2 ml der o.a. 2%igen MBK-Suspension. Durch vorsichtiges Umschütteln wurde gut durchgemischt. Nachdem sich die Blutkörperchen am Boden abgesetzt hatten, lasen wir die Reaktion im durchfallenden Licht ab. Da wir zur HA-Hemmung nur o,2 ml Hämagglutinin benutzten, war folgende Verdünnung notwendig, um im gegebenen Volumen die vierfache Agglutinationsdosis zu haben: $t_{HAH} = 8 \times t_{HA}$, wobei t_{HAH} die benutzte, t_{HA} die gerade noch agglutinierende Verdünnung bedeutet.

c) Durchführung der Hämagglutinationshemmungsreaktion:

Wir testeten zunächst alle Seren gegen das Virus aus. Zur Arbeitserleichterung benutzten wir zur Dosierung der Seren

eine Tropfpipette, bestehend aus einem Glaszylinder mit abgeschliffener Kanüle.

Die zur HA benutzten Volumina an Hämagglutinin und MBK betrugen jeweils o,2 ml. Wir stellten eine Verdünnungsreihe der Seren mit dem Faktor 2 her, mit 1:4 beginnend. Zu den Seren pipettierten wir jeweils o,2 ml Virushämagglutinin in der vorher ermittelten Konzentration hinzu. Nach 15 Minuten Einwirkungszeit gaben wir je o,2 ml der 2%igen MBK-Suspension hinzu und durchmischten gründlich. Nach Absetzen der Blutkörperchen lasen wir die Reaktion im durchfallenden Licht ab.

Zur Durchführung der HA-Hemmung der Liquores benutzten wir ebenfalls die beschriebene Tropfpipette. Wir testeten die Liquores in 2 Verdünnungen: unverdünnt und 1:4 verdünnt. Hierzu pipettierten wir jeweils o,2 ml Hämagglutinin in der vorher ermittelten Konzentration. Nach 15 Minuten Einwirkungszeit gaben wir je o,2 ml der 2%igen MBK-Suspension hinzu und durchmischten gründlich. Nach Absetzen der Blutkörperchen lasen wir die Reaktion im durchfallenden Licht ab.

An Kontrollen wurden mitgeführt:

1. Serumkontrollen in der stärksten Serumkonzentration des Testes:
Anstelle der o,2 ml HA wurde die gleiche Menge gepufferter Kochsalzlösung hinzugegeben.

2. Antigen-Kontrolle:
Mit der Hälfte der zur HA-Hemmung benutzten Konzentration beginnend wurden 5 Verdünnungsschritte mit dem Faktor 2 unternommen. Das Volumen des HA betrug jeweils analog zur Austestung o,4.

Als Hemmung bezeichneten wir hierbei nur vollständiges Fehlen einer Hämagglutination.

4. Komplementbindungsreaktion:

Wir führten die Komplementbindungsreaktion nach der Mikromethode mit verlängerter Bindungszeit bei ca. 4° C durch, wie sie bei WIGAND (1) beschrieben ist. Serum- und Antigenmenge bleiben konstant, die Komplementmenge ist variabel.

a) Reagenzien:

Folgende Reagenzien sind notwendig:

1. Hammelblutkörperchen,
2. Haemolytischer Ambozeptor,
3. Komplement,
4. Antigene,
5. die zu untersuchenden Seren,
6. die zu untersuchenden Liquores.

1. Hammelblutkörperchen:

Das durch Venenpunktion entnommene Hammelblut wurde durch Schütteln mit Glasperlen defibriniert. Eine Mischung von 5 Teilen Alseverscher Lösung und einem Teil Hammelblut wurde bei 4° aufbewahrt. Zur Herstellung der zur Komplementbindungsreaktion benötigten Erythrozytensuspension waschen wir die Blutkörperchen zunächst dreimal in Kochsalzlösung mit Zusatz von Veronal-Puffer (pH 7,2) nach MAYER u.a. (2). Von den gewaschenen Erythrozyten stellten wir eine 1o%ige Suspension in Pufferlösung her, die dann in dem haemolytischen System Verwendung fand.

2. Haemolytischer Ambozeptor:

Es handelt sich bei dem von uns verwendeten Ambozeptor um ein käufliches Anti-Hammelerythrozyten-Immunserum vom Kaninchen, das mit o,9%iger Kochsalzlösung unter Zusatz von 1% Glycerin und o,1% Phenol (Endkonzentration) im Verhältnis 1/1oo verdünnt und bei 4° aufbewahrt wurde.

3. Komplement:

Wir verwendeten Meerschweinchenserum, das im Eisbad abgefüllt und bis zum Gebrauch bei -7o° eingefroren wurde.

4. Antigene:

Wir benutzten folgende Antigene:

1) Mumps (Behring),
2) Mumps (Microbiological Associates (MBA)),
3) Influenza-A_2 (ASTA),
4) Influenza-A_2 (Behring),
5) Adenovirus-Gruppenantigen.

Als Adenovirus-Gruppenantigen benutzten wir ein Gemisch der Typen 2 und 3, die beide in HeLa-Zellkulturen gezüchtet und 3o Minuten lang auf 56° erhitzt wurden. Die Antigene Nr. 2 und 5 wurden bei -2o°, die übrigen bei +4° aufbewahrt.

5. Patientenseren:

Die Seren wurden mit Veronal-Pufferlösung im Verhältnis 1:5 und 1:2o verdünnt und in Fläschchen abgefüllt. Zur Zerstörung des Komplementes wurden sie über 3o Minuten in ein Wasserbad von 56° gestellt. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei einer Temperatur von -2o°.

6. Liquores:

Die Liquores wurden in Fläschchen abgefüllt und über 3o Minuten in einem Wasserbad von 56° inaktiviert. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei einer Temperatur von -2o°.

b) Austestung der Antigene:

Zunächst ist für die Austestung der Seren als auch der Liquores eine Komplementverdünnungsreihe notwendig. Wir benutzten, von 1:8 beginnend, eine Reihe mit dem Faktor 1,6.

Die Konzentration wird als logarithmische Reihe angegeben, und zwar als Logarithmus der in der benutzten Menge jeweils erhaltenen mm^3 natives Komplement. Die Reihe beginnt mit 1,o (Konzentration 1:2) und endet mit $\bar{2}$,4 (Konzentration 1:8oo). Meistens ist der Teil der Reihe von o,2 bis $\bar{2}$,8 ausreichend. Wir achteten darauf, daß die Temperatur des Komplementes immer möglichst niedrig war. Wir benutzten zur Austestung der Antigene und für die Titration der Seren und Liquores die gleichen Platten wie zur HA-Hemmung. Von dem Antigen stellten wir mit Veronal-Pufferlösung eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 her, z.B. von 1:4 bis 1:64. Mit der oben erwähnten Tropfpipette tropften wir von jeder Verdünnung eine Reihe mit sechs Tropfen. Auf der Platte befanden sich dann untereinander fünf Reihen zu je sechs Tropfen. Zu jedem dieser Tropfen hinzu kam die gleiche Menge käuflich erhältliches Immunserum in etwas höherer als der vom Hersteller angegebenen Konzentration. Senkrecht zu den Antigenreihen tropften wir die Komplementreihen, ebenfalls für jede Reaktion einen Tropfen. Eine Reihe von o,2 bis $\bar{1}$,2 erweist sich uns als zweckmäßig. An Kontrollen führten wir mit:

1. Eine Antigenkontrolle von jeder Antigenverdünnung, wobei statt Immunserum inaktiviertes Meerschweinchenserum in einer Verdünnung von 1:5o eingefüllt wurde.

2. Eine Komplementkontrolle, welche die Komplementstärke zeigt. Hierbei wurde das Immunserum wie oben durch Meerschweinchenserum und das Antigen durch Pufferlösung ersetzt.

3. Eine Serumkontrolle und Liquorkontrolle, bei der statt Antigen Pufferlösung eingefüllt wurde.

Für die Kontrollen waren 5 Tropfen jeweils ausreichend und eine Komplementreihe von $\bar{1}$,6 bis $\bar{2}$,8.
Die so vorbereiteten Platten wurden in feuchte Tücher eingewickelt und über Nacht bei 4^{o} in den Kühlschrank gestellt. Als Bindungszeit wurden etwa 18 Stunden gewählt. Am nächsten Tag bereiteten wir zunächst das haemolytische System zu. Auf 18 Teile Veronal-Pufferlösung gaben wir je einen Teil Ambozeptorlösung (1:1oo) und Hammelblutkörperchen (1:1o).

Das System blieb etwa 15 Minuten unter öfterem Umschütteln bei Zimmertemperatur stehen. Auf die Platten gaben wir davon pro Reaktion einen Tropfen. Über 2 Stunden wurden die Platten dann bei 37^{o} inkubiert, wieder in feuchte Tücher eingewickelt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Danach begünstigten wir durch vorsichtiges Klopfen die Ansammlung der nicht gelösten Erythrozyten am Grund der Vertiefung. Abgelesen wurde die Komplementmenge, bei der die Hälfte der Erythrozyten aufgelöst war. Zur Komplementbindungsreaktion mit den Patientenseren und Liquores benutzten wir die Antigenverdünnung mit dem Maximum an Komplementverbrauch im Vorversuch. Die Komplementkontrolle lag meist bei $\bar{2},8$ bis $\bar{1},o$.

c) Titration der Seren:

Patientenseren wurden in der Verdünnung 1:5 und 1:2o benutzt, wie sie vorher bereitet waren. Eine Komplementverdünnungsreihe von 0 bis $\bar{1},2$ bei geringfügig antikomplementären Antigenen von o,2 bis $\bar{1},4$ war für den Test ausreichend. Beim Ablesen der Reaktion sahen wir einen Unterschied von mehr als 1 1/2 Komplementverdünnungsstufen zwischen der am meisten bindenden Kontrolle (das ist in der Regel die Serumkontrolle) und der Titration als signifikante Komplementbindung an.

d) Titration der Liquores:

Die Liquores wurden meistens nicht verdünnt. Nur einige Liquores wurden in der Verdünnung 1:2 bis 1:8 getestet. Die weitere Titration der Liquores entspricht in der Methode der Titration der Patientenseren.

III. ERGEBNISSE DES HÄMAGGLUTINATIONSHEMMUNGSTESTES

1. Nachweis einer HA-Hemmung im Liquor:

Bei Durchführung von über 7o Tests zeigten 4 Liquores eine HA-Hemmung von Influenza-A_2-Virus (Hongkong).

Die Tabelle 1 zeigt die Verteilung des positiven und negativen HA-Hemmungstestes auf Antikörper gegen Influenza-A_2.

Tabelle 1
Verteilung des positiven und negativen HA-Hemmungstestes gegen Influenza-A_2-Virus (Hongkong)

	negativ	nur unverdünnt positiv	verdünnt 1:4 positiv
Anzahl der Liquores	66	1	3

2. Ergebnisse der HA-Hemmung mit Seren:

In Tabelle 2 wird die Verteilung der Titer-Höhe der HAH-Antikörper im Serum gegen Influenza-A_2 (Hongkong) dargestellt.

Tabelle 2
Verteilung der HAH-Titer im Serum gegen Influenza-A_2-Virus

Titer 1:	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	1o24	2o48	insgesamt
Serum (inakt.)	0	5	5	7	12	9	2	3	3	2	2	5o

3. Vergleich der positiven Ergebnisse des HA-Hemmungstestes der Liquores und der zugehörigen Seren:

Die Tabelle 3 zeigt den Vergleich der Titerhöhe in Liquores und den dazugehörigen Seren. Wie man sieht, haben die 4 Patienten alle mittlere bis höhere Antikörper im Serum.

Allerdings zeigen mehrere andere Patienten mit hohem Antikörpertiter im Serum keine HA-Hemmung in ihrem Liquor.

Tabelle 3

Vergleich der HA-Hemmungstiter (Influenza-A_2-Virus) in den Liquores und den dazugehörigen Seren

	Patient	Titer im Liquor	Titer im Serum
1.	Pat. I, B.	1:4	1: 8o
2.	Pat. II, Om.	1:4	1:2o48
3.	Pat. III, Gn.	1:4	1: 8o
4.	Pat. IV, Ze.	1:1	1:1o24

4. Ergänzende Untersuchungen:

Zum Ausschluß von unspezifischen Inhibitoren der HA in den 3 stärker positiven Liquores und den zugehörigen Seren wurden die Liquores mit folgenden Verfahren behandelt:

a) Behandlung mit RDE (Receptor-destroying enzyme von Microbiological Associates),
b) Behandlung mit KJO_4 (Kaliumperjodat).

ad a)

Jedem einzelnen Liquor mit einem Volumen von o,4 ml wurde o,6 ml RDE zugesetzt. Nach 18-stündiger Lagerung im Brutschrank wurde weiterhin in einem Wasserbad von 56° eine Stunde lang erhitzt.
Die zu den einzelnen Liquores gehörenden Seren mit einem Volumen von o,1 ml wurden o,4 ml RDE zugesetzt. Die weitere Inaktivierung entspricht der der Liquores.

ad b)

o,2 ml Liquores wurde o,4 ml KJO_4 zugesetzt und 15 Minuten lang stehen gelassen. Danach wurde der Mischung o,4 ml Glycerin mit gepufferter Kochsalzlösung zugesetzt. Dem zugehörenden o,1 ml Serum wurde o,3 ml KJO_4 zugesetzt und 15

Minuten stehen gelassen. Danach wurde der Mischung o,3 ml Glycerin mit gepufferter Kochsalzlösung zugesetzt.

Nach Behandlung mit RDE zeigten noch 2 der 3 Liquores eine HA-Hemmung gegen Influenza-A_2. Nach Behandlung mit KJO_4 waren alle 3 Liquores inaktiv. Demgegenüber wurde die Titerhöhe in dem Serum bei einem Patienten weder durch Behandlung mit RDE noch durch KJO_4 beeinflusst, bei dem 2. Patienten durch beide Behandlungen herabgesetzt, während eine Untersuchung des 3. Serums wegen Materialmangels nicht durchführbar war.

Die Tabelle 4 zeigt den Vergleich der Titerhöhe der HA-Hemmung von Liquor und Serum nach Behandlung mit RDE bzw. KJO_4.

Tabelle 4

HA-Hemmung von Liquor und Serum nach Behandlung mit RDE bzw. KJO_4

Material	Behandlung	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3
Liquor	-	++	++	++
Liquor	RDE	++	++	-
Liquor	KJO_4	-	-	-
Serum	-	2o48	2o48	n.u.
Serum	RDE	32o	2o48	n.u.
Serum	KJO_4	8o	2o48	n.u.

IV. ERGEBNISSE DER KOMPLEMENTBINDUNGSREAKTION

1. KBR im Liquor:

Die 7o untersuchten Liquores zeigten in keinem einzigen Fall eine positive KBR gegen Adeno-Virus-Antigen. Von 7o Liquores waren dagegen nicht weniger als 68 positiv gegen Mumps (Behring)-Antigen. Da ein großer Teil der zugehörigen Seren keine Reaktion mit dem gleichen Antigen zeigte (s. Tabelle 6), halten wir diese Liquorbefunde für unspezifisch. In der Tat reagierten 22 Liquores mit einem Mumps-Antigen von MBA (s. Tabelle 5) ausnahmslos negativ, jedoch mit Influenza-A_2-Antigen der Behringwerke positiv. Obgleich beide Firmen ein Antigen aus Allantois-Flüssigkeit vom Hühnerembryo herstellen, müssen die Antigene der Behringwerke einen Faktor enthalten, der mit einem im Liquor befindlichen Stoff in unspezifischer Weise reagiert. Influenza-A_2-Antigene der Firma ASTA reagierten nur mit 2 der untersuchten 7o Liquores positiv. Hierbei dürfte es sich um echte Antikörper handeln. Leider standen von diesen beiden Patienten keine Serumproben zur Verfügung.

Die Tabelle 5 zeigt die Verteilung der positiven KBR im Liquor mit den genannten Antigenen.

Tabelle 5
Verteilung der positiven KBR im Liquor mit den genannten Antigenen

Antigen	untersucht	davon positiv
1. Mumps Behring	7o	68
2. Mumps MBA	22	0
3. Influenza-A_2 (Hongkong) ASTA	7o	2
4. Influenza-A_2 Behring	22	22
5. Adenovirusgruppe	7o	0

2. KBR im Serum:

Von den 5o untersuchten Seren zeigten 8 eine positive KBR gegen Adenovirusantigen, davon eines mit dem Titer von 1:2o oder mehr. Gegen Mumps-Antigen (Behring) zeigten 2o eine positive Reaktion, davon 5 mit einem Titer von 1:2o oder höher. Die KBR mit Influenza-A_2-Antigen ASTA ergab nur 5 positive Reaktionen, davon 4 mit einer Titerhöhe von 1:5 und eine mit einem Titer von 1:2o.

Die Tabelle 6 zeigt die Verteilung der positiven und negativen KBR gegen Mumps-Antigen (Behring), Adeno-Virus-Antigen und Influenza-A_2 ASTA.

Tabelle 6
Verteilung der positiven und negativen KBR gegen die genannten Antigene mit Titerhöhe im Serum (5o untersuchte Seren)

Antigen	Negativ	Positiv mit Titerhöhe	
		1:5	1:2o
Mumps Behring	3o	15	5
Adeno-Viren	42	7	1
Influenza-A_2 ASTA	45	4	1

Ergänzende Untersuchungen einiger Liquores:

Um die Natur des unspezifischen komplementbindenden Faktors im Liquor, der mit den erwähnten Antigenen der Behringwerke reagiert, etwas näher zu charakterisieren, wurden einige Liquores 3o Minuten auf 62° erhitzt; der Faktor erwies sich als stabil bei dieser Temperatur. Ferner wurden Liquorproben erschöpfend gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert. Überraschenderweise erwies sich der Liquor nach Dialyse als inaktiv, während in der ersten Dialysierflüssigkeit, wenn sie genügend konzentriert gewonnen wurde, komplementbindende Aktivität nachweisbar war (s.Tabelle 7).

Tabelle 7

Ergebnis der KBR mit Mumpsantigen (Behring) bei Liquores vor und nach Erhitzung und Dialyse

Behandlung der Liquores	Titerhöhe
nicht behandelt	8
erhitzt 3o Minuten bei 56°	8
erhitzt 3o Minuten bei 62°	8
Dialyse einmal	2
Dialyse dreimal	<1
1. Dialysat	4

V. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Andere Autoren haben die Möglichkeit untersucht, antivirale Antikörper im Liquor bei klinisch manifestierten viralen Erkrankungen nachzuweisen. Da der positive Nachweis der Antikörper im Liquor offensichtlich vom Zeitpunkt der Liquorentnahme abhängig ist, wurde die Liquorentnahme an einem bestimmten Krankheitstag durchgeführt (FLEXNER und AMOS, 3). Wir dagegen verzichteten auf genaue klinische Diagnose der Erkrankungen und untersuchten beliebige erwachsene Liquor-Serum-Paare, wobei der Zeitpunkt der Liquorentnahme gleichgültig ist. Hierdurch erklärt sich, daß wir nur in geringer Zahl Antikörper im Liquor auffinden konnten.

Die Deutung einer nachgewiesenen HA-Hemmung als Antikörper gegen Influenza-A_2 (Hongkong) im Liquor wäre sicherer, wenn der HA-Hemmungstest nach Behandlung mit RDE und KJO_4 gleichbleibend positiv ausgefallen wäre. Unsere Untersuchungen zeigten, daß 2 von den 3 positiven Liquores nach Behandlung mit RDE zwar gleichbleibende HA-Hemmungsreaktion aufwiesen, nach Behandlung mit KJO_4 jedoch völlig negativ waren. Die beiden untersuchten zugehörigen Seren verhielten sich unterschiedlich, womit die Antikörpernatur im Liquor nicht völlig gesichert ist. Untersuchten wir die Zusammenhänge des positiven HA-Hemmungstestes in Liquor und Titerhöhe des HA-Hemmungstestes im Serum, so zeigten diese eine gewisse Parallelität, d.h., in den Fällen, in denen wir einen positiven HA-Hemmungstest im Liquor führen konnten, bestanden regelmäßig hohe Titer des HA-Hemmungstestes im Serum zwischen 1:8o und 1:2o48. Allerdings zeigten mehrere Personen trotz hoher Antikörper im Serum keine HA-Hemmung in ihrem Liquor. Fast alle Liquores reagierten in der KBR mit Mumpsantigen der Behringwerke positiv. Die zugehörigen Seren reagierten dagegen zum großen Teil negativ oder nur schwach positiv. Dieser Befund erscheint beachtlich hinsichtlich der Tatsache, daß ein positiver Nachweis mit Mumps-Antigen (Lederle) von LENNARTZ (4) stets mit hohem Titer des KBR-Antikörpers im Serum einherging.

Unseren Liquorbefund halten wir für unspezifisch. In der Tat reagierten 22 Liquores bei Testung mit einem Mumps-Antigen von Microbiological Associates ausnahmslos negativ, jedoch mit Influenza-A_2-Antigen der Behringwerke positiv. Auch die Beobachtung, daß der komplementbindende Faktor dialysierbar ist (s.Tabelle 7), spricht gegen seine Antikörpernatur. Andererseits ist es eine echte KBR, da die Liquorkontrollen keine antikomplementäre Aktivität zeigten und die Behring-Antigene selbst nur gering antikomplementär waren. Bei den nachgewiesenen beiden positiven KBR gegen Influenza-A_2 der Firma ASTA in den Liquores dürfte es sich dagegen um einen echten Antikörper handeln; jedoch standen von diesen Patienten keine Serumproben zur Verfügung. In ergänzenden Untersuchungen (WIGAND und GO)(5) konnte gezeigt werden, daß der in den Behringantigenen vorhandene "komplementbindende" Faktor Formaldehyd ist. Dies ergab sich u.a. daraus, daß Kontrollantigene ohne Formaldehyd die genannte Reaktion nicht zeigten.

VI. BEFUNDE AUS DEM SCHRIFTTUM

Im Themenkreis "Antivirale Antikörper im Liquor cerebrospinalis (c.sp.)" wurden bisher nur wenige Arbeiten veröffentlicht, auf die hier eingegangen werden soll.

1917 wiesen FLEXNER und AMOS (3) in Tierversuchen mit passiv gegen Poliomyelitis immunisierten Affen den Übertritt von neutralisierender Substanz in den Liquor c.sp. nach. Bei dieser Untersuchung wurde ein Normalpferdeserum intraspinal in einen Macacus rhesus eingespritzt. Danach erhielt das Tier intravenös Immunaffenserum gegen Poliomyelitis. Es wurde aus diesem Tierversuch der entnommene Liquor c.sp. mit einem aktiven Poliomyelitisinfiltrat vermischt und intracerebral einem Macacus rhesus injiziert. Die klinische Beobachtung bei diesem Versuchstier ergab keinerlei poliomyelitische Symptome.

Die intraspinale Applikation von normalem sterilem Pferdeserum erzeugt, so die Autoren, eine aseptische lokale Entzündung der cerebrospinalen Meningen. Als Folge tritt eine Erhöhung der Permeabilität auf. Infolgedessen ist die Passage von neutralisierender Substanz aus dem Blut in den Liquor c.sp. möglich. Ein zu früh oder zu spät entnommener Liquor enthält keine neutralisierende Substanz, und somit wird kein Neutralisationseffekt gegen Poliomyelitis erzeugt.

1933 fand MEYER (6) in der 5. Woche im Liquor von Patienten, die an spinaler Kinderlähmung erkrankt waren, reichlich Antikörper. Eine Mischung von diesem Liquor und Poliomyelitis-Rückenmarksextrakt erzeugt beim Affen nur eine ganz vorübergehende Erkrankung.

1949 berichtet MORGAN (7) über das Vorhandensein von Poliomyelitisantikörpern Typ II in der Spinalflüssigkeit und grauen Substanz von Affen, die früher mit Poliomyelitis-Typ II-Virus infiziert waren. Dagegen finden sich bei den Affen, die mit formalinisierten Viren immunisiert sind, hohe Titer von Antikörpern im Serum ohne nachweisbare Antikörper

im Liquor. So wurde angenommen, daß spezifische Antikörper der infizierten Affen vielleicht lokal in den entzündeten Zellen des Zentralnervensystems gebildet wurden und die Antikörper nicht vom Serum der immunisierten Tiere in den Liquor c.sp. übergegangen sind.

Eine Anzahl von Kindern, die an Poliomyelitis Typ I erkrankt waren, wurde von STEIGMAN u.a. (8) untersucht. Einige Patienten zeigten im Liquor spezifische Antikörper gegen Poliomyelitis Typ I. Der höchste Titer betrug 1:32.

Ebenso wurden neutralisierende Antikörper des Poliomyelitis-Virus Typ II neben den Masernantikörpern im Liquor c.sp. bei subakut sklerosierender Panencephalitis (SSPE) erkrankter Patienten von CONNOLLY (9) nachgewiesen. Auch bei der Louping-Ill wurden neben den spezifischen antiviralen Antikörpern neutralisierende Antikörper gegen Poliomyelitis Typ III identifiziert (WEBB u.a.)(1o).

Zahlreiche Literaturangaben fanden wir über die Virusaeteologie der SSPE. Eine außerordentliche Erhöhung der Masernantikörper im Serum und Liquor bei dieser Erkrankung wurde von verschiedenen Autoren festgestellt. CONNOLLY u.a.(11) beschrieben das Vorkommen von hohen Masern-komplementbindenden und HA-hemmenden Antikörpern in Seren und Liquores von 3 Patienten, die an SSPE erkrankt waren. Auch konnte LEGG (12) im Liquor von 22 SSPE-Patienten hohe komplementbindende Masernantikörper nachweisen. Dass allein das Masernvirus oder ein Masern-ähnliches Virus für die SSPE verantwortlich ist, wurde durch den Floreszenzantikörpernachweis bestätigt (CONNOLLY)(9).

ADELS u.a. (13), SEVER u.a. (14), GRIFFITS u. KATZ (15), HORTA-BARBAROSA u.a. (16) konnten ebenfalls Masern-Antikörper in den Liquores von an SSPE erkrankten Patienten nachweisen.

ADELS u.a. (13) konnte neben Masern-Antikörpern in einigen Fällen in den Liquores von an SSPE erkrankten Patienten auch HA-hemmende und komplementbindende Antikörper gegen Influenza-A und gegen Röteln nachweisen.

WEBB u.a. (1o) gelang der Nachweis HA-hemmender und komplementbindender und neutralisierender Antikörper im Liquor von Patienten, die an Louping-Ill erkrankt waren.

ADAMS u. IMAGAWA (17) berichteten als Erste über das Vorkommen von Masern-Antikörpern im Liquor c.sp. einiger Multiple-Sklerose-Patienten.

P.BROWN u.a. (18) fanden in den Liquores von einigen Multiple-Sklerose-Patienten außer Masern-Antikörpern Antikörper gegen Influenza-A_2, Influenza-B, Parainfluenza Typ 4, Respiratory Syncytial Virus (RSV) und Röteln, die mit der KBR und zum Teil auch mit HA-Hemmung und gemischter Hämadsorption nachgewiesen wurden.

Da Masernantikörper im Liquor den höchsten Titer aufweisen, entweder durch lokale Produktion des Antikörpers oder durch selektive Permeabilitätsstörungen der Bluthirnschranke bedingt,ist das Masernvirus als Ursache der SSPE anzusehen. Die gleichzeitig, wenn auch in geringerem Maße vorhandenen anderen antiviralen Antikörper sind durch Permeabilitätserhöhung der Bluthirnschranke durch die Encephalitis zu erklären.

1933 wurden in St.Louis während der Encephalitisepidemie in der 2. Krankheitswoche im Blut und in einigen Fällen im Liquor neutralisierende und komplementbindende Antikörper nachgewiesen (MUCKENFUSS)(19).

1953 konnte LENNARTZ (4) bei Mumpsinfektionen unter Verwendung von Standard-Lederle-Antigen komplementbindende Antikörper im Liquor nachweisen. Der positive Nachweis bei der Mumpsinfektion ist offensichtlich vom Zeitpunkt der Liquorentnahme abhängig; bis zum 6. Krankheitstag gelang der Antikörpernachweis nicht.

1969 wiesen WINDORFER und SITZMANN (2o) in einem Fall bei Lymphocytärer Chorio-Meningitis einen komplementbindenden Antikörper im Liquor in Titerhöhe von 1:5 bei einem Serumtiter von 1:32o nach.

COLLIER und KRÄMER (21) wiesen bei 1o Patienten mit Variola und neurologischen Komplikationen nur einen Fall mit HA-hemmenden Antikörpern nach. Selbst bei diesem war eine Verunreinigung mit Blut nicht ausgeschlossen.

Die bisher im Liquor identifizierten Antikörper werden in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 8

Antivirale Antikörper im Liquor cerebrospinalis aus dem Schrifttum

Virusart	Art der Antikörper	Autor und Jahrgang
Poliovirus	neutralisierende	FLEXNER u.AMOS (1917)
Poliovirus	neutralisierende	MEYER (1933)
Poliovirus TypII	neutralisierende	MORGAN (1949)
Poliovirus Typ I	neutralisierende	STEIGMANN u.a.(1958)
Poliovirus TypII	neutralisierende	CONNOLLY (1968)
Poliovirus Typ III	neutralisierende	WEBB u.a. (1968)
Masern	neutralisierende komplementbindende HA-hemmende fluoreszierende	ADAMS u.IMAGAWA(1962) CONNOLLY u.a. (1967) LEGG (1967) ADELS u.a. (1968) SEVER u.a. (1968) GRIFFITS u.KATZ(1968) HORTA-BARBAROSA u.a. (1971) BROWN u.a. (1971)
Louping-Ill	HA-hemmende komplementbindende neutralisierende	WEBB u.a. (1968)
Influenza-A_2	neutralisierende	BROWN u.a. (1971)
Influenza-A	komplementbindende HA-hemmende	ADELS u.a. (1968)
Influenza-B	neutralisierende	BROWN u.a. (1971)
Parainfluenza Typ 4	neutralisierende	BROWN u.a. (1971)
Respiratory Syncytial Virus	neutralisierende	BROWN u.a. (1971)
Röteln	HA-hemmende	ADELS u.a. (1968) BROWN u.a. (1971)
St.Louis-Virus	neutralisierende komplementbindende	MUCKENFUSS (1933)
Mumps	komplementbindende	LENNARTZ (1953)
Lymphocytär Chorio-Meningitis	komplementbindende	WINDORFER (197o)
Pocken	HA-hemmende ?	COLLIER u. KRÄMER (1954)

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Liquores und Seren von 5o beliebigen erwachsenen Personen und 2o einzelne Liquores wurden in einigen virusserologischen Testen untersucht. 3 Liquores zeigten einen positiven HA-Hemmungstest mit Influenza-A_2(Hongkong)-Antigen, die zugehörigen Seren zeigten Titerhöhen von 1:8o bis 1:2o48. Nach Behandlung mit RDE (Receptor-destroying enzyme) blieb die HA-Hemmungsreaktion bei 2 der 3 Liquores positiv; nach Behandlung mit KJO_4 zeigten alle 3 Liquores einen negativen Befund. Es ist danach nicht ausgeschlossen, daß es sich um unspezifische Inhibitoren handelt.

In der Komplementbindungsreaktion wurden Mumps-, Influenza-A_2 und Adenovirus-Gruppenantigen verwendet. Die Liquores erbrachten mit Adeno-Antigen negative Befunde. 2 Liquores reagierten positiv mit Influenza-A_2 ASTA, wobei es sich um echte Antikörper handeln dürfte.

Mit Mumpsantigen der Behringwerke zeigten die meisten Liquores eine positive Komplementbindung, wobei es sich jedoch um eine unspezifische Reaktion handelt. Das zugehörige "Antigen" ist der Formaldehydanteil der Antigenpräparation, der "Antikörper" im Liquor ist ein bei 62° C stabiler, dialysabler Faktor.

Abschließend werden die Befunde über das Vorkommen antiviraler Antikörper im Liquor aus dem Schrifttum diskutiert.

VIII. SCHRIFTTUMVERZEICHNIS

1. WIGAND, R.: Erfahrungen mit der Mikromethode der Komplementbindungsreaktion. Z.Hyg. 143 (1956): 188-191

2. MAYER, M.M., OSLER, A.G., BIER, O.G., and HEIDELBERGER, M.: The activating effect of magnesium and other cations on the hemolytic function of complement. J.Exper.Med. 84 (1946): 535-538

3. FLEXNER, S. and AMOS, H.L.: The passage of neutralising substances from blood into the cerebrospinal fluid in poliomyelitis. J.Exper.Med. 25 (1917): 499-5o5

4. LENNARTZ, H.: Antikörpernachweis im Liquor bei der Mumpsinfektion. Klin.Wschr. 31 (1953): 957

5. WIGAND, R., GO, B.: A dialysable factor in the cerebrospinal fluid, fixing complement with formaldehyde (Brief Report). Zeitschrift für Immunitätsforschung (im Druck)

6. MEYER, R.: Specifité de la neutralisation in vitro du virus de la poliomyelitique par la liquide cephalorachidien de convalescent. Comp.rend.soc.biol. 111 (1933): 1o1o

7. MORGAN, I.M.: Level of serum antibody associated with intracerebral immunity in monkeys vaccinated with Lansing poliomyelitis virus. J.Immunol. 62 (1949): 3o1-31o

8. STEIGMAN, J.A., LIPTON, M.M. and DIZON, F.C.: Poliovirus antibody in cerebrospinal fluid. Amer.Med.J.Disease Child. 96 (1958): 543

9. CONNOLLY, J.H.: Additional date on measles virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis. Neurology. 18 (1968): 87-89

1o. WEBB, H.E., KANE, F.F., CONNOLLY, J.H. and O'REILLY, K.J.: Laboratory infections with louping-ill with associated encephalitis. Lancet. 2 (1968): 255-258

11. CONNOLLY, J.H., ALLEN, I.V., HURWITZ, L.J. and MILLER, J.H.D.: Measles-virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis. Lancet. 1 (1967): 542

12. LEGG, N.J.: Virus antibodies in subacute sclerosing panencephalitis: a study of 22 patients. Brit.med.J. 3 (1967): 35o-352

13. ADELS, B.R., GAJDUSEK, D.C., GIBBS jr., C.J., ALBRECHT, P., ROGERS, N.G.: Attemps to transmit subacute sclerosing panencephalitis and isolate a measles related agent, with a study of the immune response in patients and experimental animals. Neurology. 18 (1968): 3o-5o

14. SEVER, J.L. and ZEMAN, W.: Serological studies of measles and subacute panencephalitis. Neurology. 18 (1968): 95-97

15. GRIFFITH, J.F. and KATZ, F.L.: Subacute sclerosing panencephalitis, laboratory finding in 6 cases. Neurology. 18 (1968): 98-1oo

16. HORTA-BARBAROSA, L., KREBS, G., LEY, A., CHEN, T.C., GILKESON, M.R., SEVER, J.L.: Progressive increase in cerebrospinal fluid measles antibody levels in subacute sclerosing panencephalitis. Pediatrics. 47 (1971): 782-783

17. ADAMS, J.M. and IMAGAWA, D.T.: Measles antibodies in multiple sclerosis. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 111 (1962): 562-566

18. BROWN, P., CATHALA, F., GAJDUSEK, D.C., GIBBS jr., D.J.: Measles antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis (357o4). Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 137 (1971): 956-961

19. MUCKENFUSS, R.S.: Clinical observation and laboratory investigations on the 1933 epidemic of encephalitis in St.Louis. Bull.N.Y.Acad.Med.1o(1934): 444

2o. WINDORFER, A., SITZMANN, F.C.: Neurologische Erkrankungen durch Enteroviren bei Kindern. Deutsch.Med.Wschr. 94 (1969): 2o71-2o75

21. COLLIER, W.A. und KRÄMER, W.: Hämagglutination durch Pocken-Virus. 9 Untersuchungen über den Übergang von Pocken-Virus-Antihämagglutinin in den Liquor cerebrospinalis. Ant.V.Leeuwenhoek 16 (1954): 79

Ich möchte meinen herzlichen Dank aussprechen:

Herrn Professor Dr.med. R. Wigand für die Überlassung des Themas und die hilfreiche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit,
Herrn Professor Dr.med. G. Wolf und Herrn Dr. med. R.Hirth, Universitätsnervenklinik Homburg, für die entgegenkommende Überlassung der Seren und der Liquores.

L E B E N S L A U F

Am 6.2.1933 wurde ich in Sepandjang/Indonesien als Sohn des Kaufmanns Go, Bing-Hoo und seiner Ehefrau Yap, Kiem-Nio geboren. Nach dem Besuch der Volksschule von 1939 bis 1947 besuchte ich die Höhere Schule in Surabaya und legte dort 1953/54 das Abitur ab. Nach Erlangung meines Propadeutik-Examens an der Medizinischen Fakultät Airlangge im Jahre 1955 habe ich bis 1959 in der Nan-Yang-Junior High School in Surabaya elementäre Chemie unterrichtet. Vom Sommersemester 196o an studierte ich an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes Medizin und bestand die naturwissenschaftliche Vorprüfung im März 1961, die ärztliche Vorprüfung im Oktober 1962 und die ärztliche Prüfung im Dezember 1965.

Nach Ableistung meiner zweijährigen Medizinalassistentenzeit in den Kliniken Quierschied und Neunkirchen der Bundesknappschaft von 1966 bis 1968 arbeitete ich von März 1968 bis Febr. 1969 in der Klinik Neunkirchen (Röntgenabteilung). Seit 1969 bin ich in der Klinik Quierschied als Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung beschäftigt.